

II. УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМОВ К ВНЕШНИМ ФАКТОРАМ

ПРОТЕКТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАСЕКОМЫХ: ТЕМПЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ *

С. И. Черныш, Н. А. Гордя, Н. А. Филатова

Кафедра энтомологии С.-Петербургского государственного университета

Protective mechanisms in insects: rates of molecular and phenotypical evolution

S. I. Chernysh, N. A. Gordja, N. A. Filatova

Department of Entomology St. Petersburg State University

Rates of molecular evolution of insect protective mechanisms were considered using primary structure modification of defensins, invertebrate antimicrobial peptides as a model. Analysis of 484 pairs of amino acid sequences shows that one amino acid replacement takes in average 10–12 million years. Conservative nature of defensins variability dramatically contrast with fast phenotypical adaptation to environmental alterations occupying usually in insects a period from several to several dozens years.

It is supposed that protective proteins and peptides evolution includes two steps: step of adaptive evolution (from gene duplication to the forming of new protein function) where positive natural selection is a major driving force, and step of postadaptive (neutral) evolution where stabilizing selection and gene drift predominate.

Предки насекомых, покинув морскую среду в девонском периоде, в течение примерно 400 млн лет плотно заселили все географические зоны и биотопы суши. Темпы таксономической эволюции насекомых оказались настолько высокими, что около 90% современных видов животных принадлежат к этому классу. Глобальный успех насекомых обусловлен многими факторами, включая эффективные механизмы адаптации к неблагоприятным внешним условиям. Способствуя биологическому прогрессу группы, протекторные механизмы и сами служили объектом эволюционных преобразований. До недавнего времени о характере и темпах этих преобразований можно было судить лишь на основании сравнительных оценок сложных и зачастую неподдающихся однозначной интерпретации признаков фенотипа. Накопление знаний в области биохимии и молекулярной биологии позволило создать иную методологию эволюционного анализа, основанную на подсчете количества замен аминокислот в гомологичных белках или оснований в гомологичных участках ДНК и РНК видов с различной степенью филогенетического родства.

Целью настоящей работы является сравнительный анализ закономерностей фенотипической и молекулярной эволюции протекторных механизмов насекомых. В качестве моде-

* Настоящая работа поддержана грантом РФФИ № 99-04-49660.

© С. И. Черныш, Н. А. Гордя, Н. А. Филатова, 1999

2 Фенотипической эволюции использованы известные примеры изменений сезонных адаптаций при расселении особей за пределами сложившегося ареала вида, а также приобретения ими устойчивости к токсинам. В том и другом случае изменения фенотипа происходят исключительно быстро, иллюстрируя эффективность положительного естественного отбора. В качестве модели молекулярной эволюции использованы преобразования первичной структуры гомологичных антимикробных пептидов насекомых и других беспозвоночных. Расчеты показывают, что изменения молекулярной структуры происходили в сотни раз медленнее, чем наблюдаемая фенотипическая эволюция сезонных адаптаций и устойчивости к токсинам. Полученные результаты обсуждаются с позиций теорий естественного отбора и нейтральной эволюции [1].

Фенотипическая эволюция устойчивости насекомых к повреждающим факторам среды

Со времени открытия явления индустриального меланизма насекомые предъявили немало подтверждений теории естественного отбора. Здесь мы остановимся на двух из них, значимость которых в контексте настоящей статьи состоит в большой хронологической точности наблюдения за темпами эволюционных преобразований.

Первый пример связан с историей расселения колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* на Европейском континенте. Впервые колорадский жук, абориген юга Северной Америки, появился на западном побережье Европы в начале XX века. На протяжении 30–40 лет жук заселил большую часть европейского континента. При этом параметры фенотипической реакции в новом ареале изменились таким образом, что поливольтинный сезонного цикла, характерный для популяций исходного ареала, сменился моновольтинным, и большинство европейских популяций колорадского жука дают лишь одно поколение в году [2]. Формирование диапаузы в каждом поколении позволяет жуку гарантированно переживать более суровые зимы европейского континента ценою менее эффективного использования теплого времени года.

Другой замечательный пример фенотипической эволюции дает быстрое и массовое приобретение насекомыми устойчивости к органическим инсектицидам. Так, ДДТ впервые применен в 1943 г., а уже к 1948 г. многие популяции комнатной мухи приобрели устойчивость к этому яду [3]. К настоящему времени тысячи видов и локальных популяций потеряли чувствительность к одному или нескольким инсектицидам. В большинстве случаев устойчивость обусловлена появлением детоксицирующих ферментов, способных быстро инактивировать яд в тканях насекомого. Чаще всего функцию детоксикации выполняют микросомальные оксидазы и, прежде всего, ключевой фермент этого комплекса — цитохром P450, представленный большим количеством изоформ. Полиморфизм цитохрома P450 и соответствующего мультигенного комплекса обеспечивает обильный материал для естественного отбора.

Наряду с такими быстро эволюционирующими системами у насекомых можно встретить и более консервативные. Один из общеизвестных примеров такого рода дают белки теплового шока, структурно и функционально сходные у эу- и прокариот. Темпы эволюции тепло-шоковых белков несопоставимо медленны по сравнению с темпами эволюции детоксицирующих ферментов или параметров сезонного цикла в приведенных выше примерах. К эволюционно консервативным механизмам, вероятно, следует отнести и системы репарации повреждений ДНК, организованные сходным образом у всех эукариот, а также ней-

роэндокринный механизм реакции стресса, многие элементы которого проявляют сходство у насекомых и позвоночных [4].

Таким образом, среди протекторных механизмов насекомых можно найти примеры как крайней эволюционной пластичности, так и эволюционного консерватизма. Быстрые адаптивные изменения сезонного цикла или устойчивости к инсектицидам в приведенных выше примерах, как мы полагаем, обусловлены феноменом преадаптации. Не случайно именно колорадский жук преуспел в экспансии за пределы видового ареала, поскольку склонность к моновольтинизму, создавшая базу для успешного расселения в новой климатической зоне, проявляется и в популяциях американского континента. Жесткая элиминация недиапаузирующих особей в осенне-зимний период обеспечила эффективный отбор в пользу моновольтинного сезонного цикла.

Точно также насекомые оказались преадаптированы к внезапному появлению казалось бы совершенно новых повреждающих факторов — органических инсектицидов. Материальной основой преадаптации, очевидно, послужили универсальные детоксицирующие системы типа микросомальных оксидаз смешанной функции, обязанные своим существованием прежде всего огромному разнообразию и широкому распространению токсинов растений. Древние механизмы детоксикации корма оказались вполне пригодными для быстрого приобретения устойчивости к инсектицидам. Особую роль здесь, по-видимому, сыграли гипервариабельные мультигенные комплексы наподобие генов цитохрома P-450.

Молекулярная эволюция механизмов устойчивости на примере антимикробных цитотоксических пептидов

В качестве модели молекулярной эволюции в настоящем разделе рассмотрены данные относительно скорости замен аминокислот в сиквенсах дефензинов насекомых, скорпионов и моллюсков.

Насекомые обладают высокоразвитой системой неспецифического иммунитета к патогенным микроорганизмам, в состав которой входят, наряду со специализированными клеточными элементами, разнообразные факторы гуморального иммунитета [5]. Функции некоторых из этих факторов, например, лектинов и ферментов фенолоксидазного каскада, связаны с распознаванием и изоляцией инородных частиц, другие оказывают прямое цитотоксическое действие на микробные клетки.

Цитотоксические факторы насекомых имеют пептидную природу и отличаются большим видовым разнообразием [6, 7]. За последнее десятилетие из насекомых выделено более ста бактерицидных и фунгицидных веществ, большинство из которых объединяется в 4 группы: дефензины, цекропины, пролин- и глицинбогатые пептиды.

Наиболее широко распространены у насекомых и родственных им групп беспозвоночных представители семейства дефензинов — катионных полипептидов с длиной цепи 38–43 аминокислоты, включая 6 остатков цистеина, связанных тремя дисульфидными мостиками. Дефензины насекомых отличаются от других семейств цитотоксических пептидов характерной структурой, а также избирательной токсичностью для Грам-положительных бактерий и некоторых мицелиальных грибов.

К настоящему времени дефензины охарактеризованы у представителей 20 видов насекомых из отрядов Diptera, Trichoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Neuroptera, Hemiptera и Odonata, а также у хеллицеровых и моллюсков [8]. Благодаря этому история дефензинов может быть прослежена с разной степенью подробности на глубину 600–700 млн лет, начиная с предполагаемого времени дивергенции предков моллюсков и членистоногих.

Данные по количеству замен аминокислот в сиквенсах дефензинов беспозвоночных (эволюционному расстоянию), выраженные в единицах PAM (point accepted mutations) на аминокислотных остатках (а. к.) [9], показывают (рис. 1), что зависимость эволюцион-

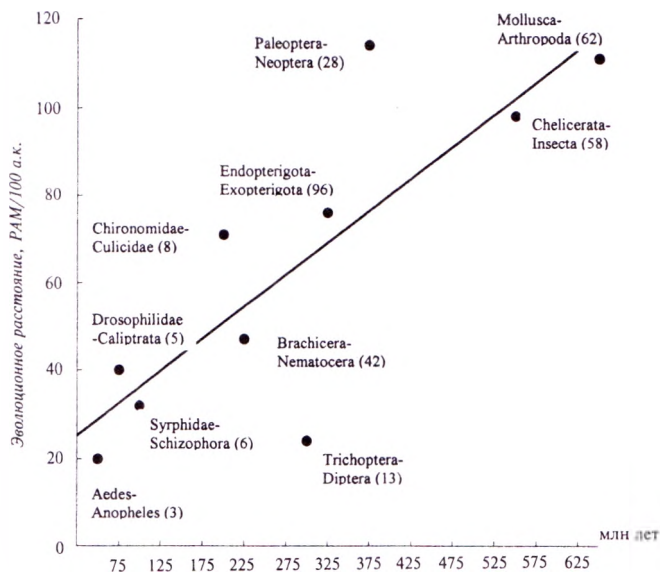


Рис. 1. Зависимость количества замен аминокислот в структуре дефензинов от времени дивергенции групп беспозвоночных:

Цифры в скобках соответствуют количеству пар сравнения аминокислотных сиквенсов

ного расстояния от времени дивергенции групп в целом носит линейный характер. Такой характер зависимости, согласно теории нейтральности [1], свидетельствует о том, что в эволюции дефензинов доминировала фиксация адаптивно нейтральных мутаций. Средняя скорость фиксации мутационных изменений структуры дефензинов, рассчитанная на основе анализа 484 пар аминокислотных сиквенсов, составляет $22,2 \pm 0,4$ PAM/100 а. к. за 100 млн лет. Следовательно, замена аминокислот в сиквенсе дефензинов происходила в среднем один раз за 10–12 млн лет. Эта скорость сопоставима с темпами эволюции других функционально важных белков насекомых, супероксиддисмутазы и глицеролтрифосфатдегидрогеназы [10].

Точность молекулярных часов, под контролем которых протекала эволюция дефензинов, далеко не абсолютна. Более тщательный анализ позволяет выделить три формы нарушений точности их хода. Во-первых, сравнение некоторых таксонов (рис. 1) дает заметно более высокие (Paleoptera-Neoptera) или низкие (Trichoptera-Diptera) значения скоростей фиксации мутаций по сравнению с линией тренда. Во-вторых, анализ сестринских групп таксонов (рис. 2) показывает, что в некоторых группах членистоногих эволюция дефензинов проходила явно замедленными темпами. По-видимому, не случайно в эту категорию попали скорпионы (Chelicerata) и стрекозы (Odonata), морфологическая эволюция которых также протекала медленнее, чем в большинстве отрядов насекомых.

Mollusca	Chelicerata (4)	4,5±0,3
	Arthropoda (62)	17,1±0,7
Chelicerata	Paleoptera (2)	5,5±0,5
	Neoptera (58)	18,3±0,8
Paleoptera	Hemiptera (4)	34,0±3,3
	Endopterigota (24)	30,0±1,5
Hemiptera	Trichoptera (4)	19,5±2,0
	Diptera (52)	22,4±0,8
	Hymenoptera (4)	27,5±2,5
	Coleoptera (32)	25,1±0,7
	Neuroptera (4)	30,2±2,8

Рис. 2. Относительные скорости эволюции дефензинов членистоногих (РАМ/100 аминокислот за 100 млн лет):

Цифры в скобках соответствуют количеству пар сравнения аминокислотных сиквентов

В-третьих, закономерные изменения в скорости фиксации мутаций демонстрирует анализ филогетической эволюции большинства изученных видов насекомых. В качестве примера на рис. 3 представлены оценки скорости эволюции дефензина в филогенетиче-

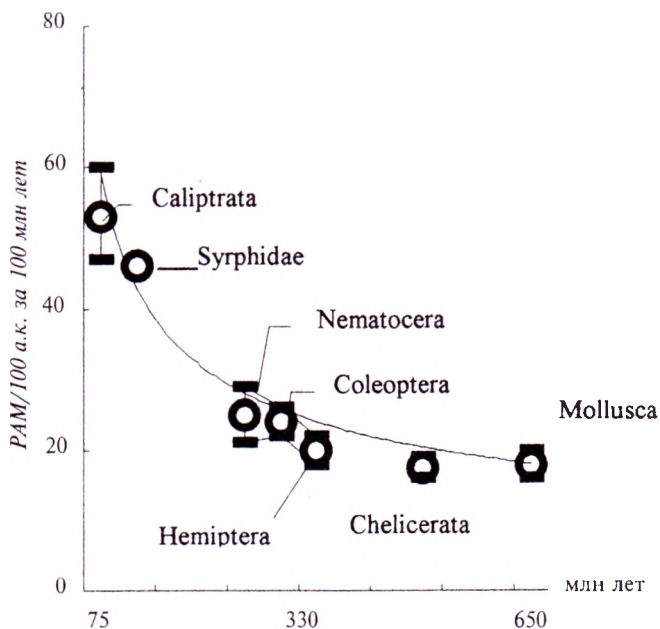


Рис. 3. Изменение скорости фиксации мутаций в процессе эволюции дефензина дрозофилы:

Цифры на графике (справа налево) соответствуют среднему количеству ($M \pm m$) замен аминокислот за 100 млн лет в структуре дефензина *Drosophila melanogaster* по сравнению с дефензинами моллюска *Mytilus edulis* ($n=2$), скорпионов ($n=2$), клопов ($n=4$), жуков ($n=8$), комаров ($n=6$), мух-журчалок Syrphidae ($n=1$), мух семейств Calliphoridae и Sarcophagidae ($n=5$)

ском ряду, ведущем к *Drosophila melanogaster*. Оценки получены путем последовательного сравнения дефензина дрозофилы с дефензинами моллюсков (Mollusca), скорпионов (Chelicerata), клопов (Hemiptera), жуков (Coleoptera), комаров (Nematocera), цветочных мух (Syrphidae) и мух семейств Calliphoridae и Sarcophagidae (группа Caliptrata). Судя по форме полученной кривой, скорость фиксации мутаций в этом филогенетическом ряду экспоненциально возрастала на всем доступном анализу отрезке времени. За редким исключением, сходные изменения темпов эволюции можно наблюдать в большинстве филогенетических линий насекомых, доступных в настоящее время для анализа, в частности, в линиях, ведущих к родам *Phormia*, *Calliphora*, *Eristalis*, *Aedes* и *Anopheles* (двукрылые), *Pyrrhocoris*, *Palomena*, *Podisus* (полужесткокрылые).

Результаты анализа структуры дефензинов насекомых, хелицерных и моллюсков, в целом, согласуются с теорией нейтральности, согласно которой основной причиной молекулярной эволюции служит случайная фиксация в генотипе селективно нейтральных мутаций. Дрейф генов дает логичное объяснение медленной дивергенции структуры дефензинов. Отсюда следует, что большинство различий в структуре дефензинов современных беспозвоночных не имеют адаптивного смысла. В то же время из истории медицины хорошо известно, что устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий зачастую появляются в течение немногих лет или даже месяцев. В связи с этим возникает вопрос, почему дефензины и другие пептидные антибиотики насекомых, оставаясь практически неизменными на протяжении десятков миллионов лет, сохранили антимикробную активность. В поисках ответа на этот вопрос необходимо иметь в виду следующее.

Во-первых, каждый вид насекомых использует для защиты от патогенов пул из многих (в отдельных случаях нескольких десятков) бактерицидных и фунгицидных пептидов. Одновременно с этим звеном функционируют другие механизмы гуморального и клеточного иммунитета. Возможно, приобретение устойчивости к такой многокомпонентной системе представляет трудноразрешимую задачу для многих видов микроорганизмов. С этой точки зрения многокомпонентный характер иммунного ответа служит ограничителем давления естественного отбора и, соответственно, одним из факторов эволюционного консерватизма.

Во-вторых, в ходе эволюции иммунной системы древние компоненты типа дефензинов неоднократно дополнялись новыми семействами цитотоксических пептидов. Примером такого новообразования служат металлинкины, специфичные для клопов-щитников [11], и в еще большей степени — уникальный пептид танатин, обнаруженный только у одного вида клопов *Podisus maculiventris* [12]. Находки пептидов, специфичных для отдельных отрядов, семейств и более мелких таксонов свидетельствуют о том, что обновление репертуара эффекторов сопровождало не только ранние, но и позднейшие этапы становления иммунной системы насекомых. При этом более древние антибиотики могли восстанавливать антимикробную активность, например, выступая в качестве синергистов новых компонентов цитотоксического комплекса.

В-третьих, среди патогенных микроорганизмов лишь немногие относятся к специализированным паразитам. Круг условно патогенных сапрофитных форм значительно шире, а частота их встречаемости выше. Для таких форм насекомые не являются постоянной экологической нишей и, соответственно, селективный пресс со стороны факторов иммунной системы для них может быть незначительным. Возможно, именно противодействие неспециализированным условно патогенным микроорганизмам и составляет основную функцию

подобных механизмов иммунитета. Впрочем, нет оснований полностью отрицать и роль цитотоксических пептидов в устойчивости насекомых к специализированным патогенам. Здесь они могут выступать в качестве одного из факторов динамического равновесия в системе «паразит-хозяин», сдерживая чрезмерную экспансию паразита и в то же время оставляя ему возможность эксплуатации определенной части популяции хозяина.

Как мы полагаем, перечисленные выше факторы и позволили дефензинам и другим пептидным антибиотикам сохранять антимикробную активность на протяжении длительных исторических периодов, измеряемых сотнями миллионов лет.

Консервативный характер изменчивости дефензинов резко контрастирует с быстрой адаптацией насекомых к изменениям среды обитания. В приведенных выше примерах адаптация к новым условиям (изменению климата при переселении, появлению нового токсина) занимает от нескольких до нескольких десятков лет. В то же время каждое элементарное событие в эволюционной истории дефензинов занимало десятки миллионов лет.

Различия эти, скорее всего, не случайны и отражают важную общую закономерность эволюционного процесса, согласно которой темпы адаптивной эволюции признаков фенотипа намного, возможно в сотни тысяч раз, опережают скорость эволюции большинства исследованных белков и кодирующих их структурных генов. Парадокс состоит в том, что изменения первых должны базироваться на изменениях вторых и, следовательно, не могут опережать их. Разрешение этого парадокса еще ждет своих исследователей. Мы же ограничимся лишь некоторыми предварительными замечаниями по этому поводу.

Медленный, дивергентный и более или менее равномерный характер молекулярной эволюции, как было отмечено выше, обусловлен главным образом накоплением нейтральных мутаций в результате дрейфа генов. Развивая эту мысль, можно предположить, что эволюция белков и соответствующих генов включает два этапа:

— этап адаптивной эволюции (от дубликации гена до формирования новой функции белка). На этом этапе главной движущей силой служит положительный дарвиновский отбор. В случае дефензинов насекомых этап адаптивной эволюции, возможно, завершился примерно 600 миллионов лет назад, в период дивергенции предков моллюсков и членистоногих.

— этап постадаптивной (нейтральной) эволюции. На этом этапе преобладает стабилизирующий отбор, тем более жесткий, чем более важную функцию выполняет данный белок. Темпы эволюции резко замедляются, а основной движущей силой становится дрейф генов.

Судя по аналогии с быстрой эволюцией адаптивно важных признаков фенотипа, этап адаптивной эволюции может охватывать период, измеряемый несколькими поколениями, за которым следуют миллионы лет относительного эволюционного застоя. Впрочем, следует подчеркнуть, что различия двух этапов, скорее всего, носят количественный характер. В изменившихся условиях (например, при новой дубликации гена) роль положительного отбора может возрасти, приведя к новому этапу адаптивной эволюции.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М., 1985. 398 с.
2. Горышин Н. И., Волкович Т. А., Саулич А. X., Шахова Н. Н. Сравнительно-экологическое изучение популяций колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) из Европейской части СССР // Энтомол. обозр. 1987. Т. 66, вып. 2. С. 225–235.
3. Quarterman K. D., Schoof H. F. The status of insecticide resistance in arthropods of public health importance in 1956 // Am. J. Trop. Med. Hyg., 1958. Vol. 7, № 1. P. 74–83.

4. Chernysh S. I. Neuroendocrine system in insect stress// Hormones and metabolism in insect stress, CRC Press, Raton. 1990. P. 68-97.
5. Gillespie J. P., Kanost M. R. and Trenczek T. Biological mediators of insect immunity // Annu. Rev. Entomol. 42. P. 611-643.
6. Hetru C., Hoffmann D., Bulet P. Antimicrobial peptides from insects // Molecular mechanisms of immune response in insects (P. T. Brey and D. Hultmark, Eds), Chapman & Hall, London etc., 1997. P. 40-66.
7. Chernysh S. I. Antimicrobial substances from insects// Bioresources and Biotechnology, Proceedings of the I Russia joint symposium, Taejon. 1996. P. 281-296.
8. Charlet M., Chernysh S. I., Philippe H. et al. Innate immunity. Isolation of several cystein-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* // J. Biol.Chem. 1996. Vol. 271, № 36. P. 21808-21813.
9. Dayhoff M. O., Eck R. V., Park C. M. A model of evolutionary change in proteins // Atlas of protein sequence structure, Natl. Biomed. Res. Found. Washington. 1972. Vol. 5. P. 89-99.
10. Ayala F.J. Molecular polymorphism and rates of evolution // XX International Congress of Entomology, Moscow, Aug.25-31.1996. P. XXV-XXVIII.
11. Chernysh S. I., Cociancich S., Briand J.-P. et al. The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Myndus prasina*: identification of a novel family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin // Insect Biochem. Molec. Biol. 1996. Vol.42, № 1. P. 81-89.
12. Fehlbaum P., Bulet P., Chernysh S. et al. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides // Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 1221-1225.